

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen – Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. H.-B. Wuermeling

**ZUR SPEZIFITÄT DER
MENSCHLICHEN SERUM-PARAOXONASE
(EC 3.1.1.2.)
Versuche mit Paraoxon, p-Nitro-phenyl-acetat**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen – Nürnberg

vorgelegt von
Yahya Kumala
aus Jakarta, Indonesien

1984

1984 # 247

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. H.-B. Wuermeling

Z U R S P E Z I F I T Ä T
D E R
M E N S C H L I C H E N S E R U M - P A R A O X O N A S E
(E C 3 . 1 . 1 . 2 .)

Versuche mit Paraoxon, p-Nitro-phenyl-acetat

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde
der ~~Hohen~~ Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Yahya Kumala
aus
Jakarta, Indonesien

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.1984

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

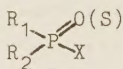
1.	Zunordnung und Abgrenzung der Paraoxonase.....	2
2.	Problemstellung.....	14
3.	Beschreibung der verwendeten Substrate.....	15
3.1.	Paraoxon.....	15
3.2.	p-Nitrophenylacetat.....	17
4.	Methodik.....	18
4.1.	Messung der Paraoxonase-Aktivität nach <u>Krisch</u> (1968)	18
4.2.1.	Berechnung der äquivalenten Menge von p-Nitro- phenylacetat.....	21
4.2.2.	Auswahl des pH-Wertes.....	21
4.3.	Abänderung der Versuchsanleitung nach Krisch (1968)	23
4.4.	Präzisionsbestimmung.....	24
4.5.	Analytisches Vorgehen.....	26
5.	Ergebnisse.....	28
6.	Auswertung.....	31
6.1.	Auswertung der Hydrolyse von Paraoxon (bei pH 11,2 und pH 7,0).....	31
6.2.	Auswertung der Hydrolyse von p-Nitrophenyl- acetat durch menschliches Serum.....	36
7.	Zusammenfassung und Diskussion.....	41
8.	Literaturverzeichnis.....	43

E I N L E I T U N G

1. Z U O R D N U N G U N D A B G R E N Z U N G D E R P A R A O X O N A S E

Organophosphate sind schon seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt. Die große Bedeutung, die sie heute besitzen, verdanken sie aber erst der Entdeckung ihrer ausgezeichneten insektiziden und akariziden Eigenschaften. Damit begann die systematische Synthese von ihren Derivaten.

Vor allem von G. Schrader wurden in den vierziger Jahren viele heute bekannten Verbindungen, wie das E 605, synthetisiert. G. Schrader bezeichnete 1950 das Grundgerüst der biologisch aktiven Phosphorsäureester mit der folgenden Formel:



wobei für R_1 und R_2 Alkoxy-, Alkyl- und Arylgruppen oder Reste von Aminen in Frage kommen. X stellt den aciden Rest einer organischen oder anorganischen Säure dar.

Bei der Suche nach neuen Substanzen ist das Verhältnis zwischen insektizider Wirkung und Warmblüter-Toxizität von großer Bedeutung.

Eine Auflistung von bekannten und auch der in dieser Arbeit erwähnten Organophosphaten findet sich in der Tabelle 1.

Tab. 1: Liste erwähnter Organophosphate und deren chemischen Bezeichnungen

Chlorthion	=	0,0-dimethyl-O-(m-chlor-p-nitrophenyl)-thionophosphat
Dicaphon, iso-Chlorthion	=	0,0-dimethyl-O-(o-chlor-p-nitrophenyl)-thionophosphat
Dicaphoxon	=	0,0-dimethyl-O-(o-chlor-p-nitrophenyl)-phosphat
Di-desmethyl-Paraoxon	=	0-p-nitrophenyl-phosphat
EPN ^R , EPN 300 ^R	=	0-äthyl-O-p-nitrophenyl-phenyl-thionophosphat
Fenitroxon, Sumioxon	=	0,0-dimethyl-O-(m-methyl-p-nitrophenyl)-phosphat
Methyl-Paraoxon	=	0,0-dimethyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat
Methyl-Parathion	=	0,0-dimethyl-O-(p-nitrophenyl)-thionophosphat
Monodesmethyl-methyl-Paraoxon	=	0-methyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat
Paraoxon, Mintacol ^R , E 600	=	0,0-diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat
Parathion, Nitrostigmin, E 605	=	0,0-diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thionophosphat
PO-EPN	=	0-äthyl-O-(p-nitrophenyl)-phenyl-phosphat
iso-propyl-Paraoxon	=	0,0-di-iso-propyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat
n-propyl-Paraoxon	=	0,0-di-n-propyl-O-(p-nitrophenyl)-Phosphat
Sumithion, Folithion ^R	=	0,0-dimethyl-O-(m-methyl-p-nitrophenyl)-thionophosphat

Die Wirkung der Organophosphate beruht auf einer Hemmung der Cholinesterase (E C 3.1.1.7. bzw 3.1.1.8.)

Die auftretenden Symptome z.B. bei einer akzidentiellen oder suizidalen Einnahme sind die Folgen einer inneren Acetylcholinvergiftung (Anhäufung von Acetylcholin in der Synapse infolge der Blockade des Acetylcholin abbauenden Enzyms Cholinesterase durch die Organophosphate).

Bei den Thiono-phosphorsäureestern wird die toxische Wirkung durch einen im Körper ablaufenden, als " Giftung " bezeichneten Ersatz des zweiwertigen Schwefels durch ein Atom Sauerstoff erreicht (oxydative Desulfurierung).

Physiologisch wird Acetylcholin von der Cholinesterase unter Verbrauch von einem Molekül Wasser in Cholin und Essigsäure gespalten. Bei dieser enzymatischen Reaktion stellt die Deacetylierung des während der Umsetzung kovalent am esteratischen Zentrum gebundenen Acetats den geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt dar.

Werden nun als Substrate die insektiziden Phosphorsäureester hydrolytisch gespalten, erfolgt dann analog eine Phosphorylierung der Cholinesterase an ihrem aktiven Zentrum.

Die Dephosphorylierung verläuft im Gegensatz zur Deacetylierung jedoch so langsam, daß praktisch eine irreversible Schädigung oder Blockierung des Enzyms vorliegt. Zum Beispiel benötigen die phosphorylierte Cholinesterase des Gehirns circa 50 Tage und die phosphorylierte Cholinesterase der Erythrocyten rund 100 Tage, bis sie vollständig neusynthetisiert sind. Daneben ist die Reversibilität der Hemmung der Cholinesterase auch noch von den chemischen Eigenschaften des betreffenden Phosphorsäureesters abhängig.

Somit ist die Cholinesterase zwar befähigt, Organophosphate esteratisch zu spalten, sie wird aber dabei gehemmt und es kommt zu keiner quantitativ nennenswerten Spaltung der organischen Phosphatverbindungen.

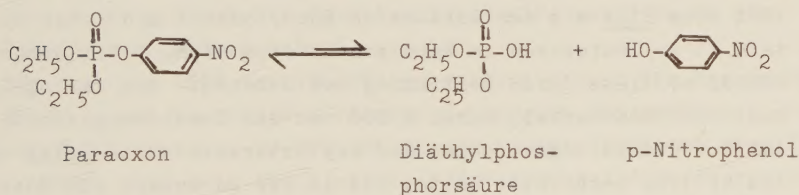
Die meisten Organophosphate werden sowohl per inhalationem als auch über den Gastrointestinaltrakt und aufgrund ihrer guten Lipoidlöslichkeit durch die intakte Haut schnell und leicht resorbiert. Im Organismus werden sie vor allem durch die hydrolytische Spaltung der Esterbindung des aciden Restes metabolisiert. Die dabei entstehenden polaren Verbindungen können mit dem Urin durch die Niere ausgeschieden werden. Weitere bekannten Entgiftungsmechanismen sind Oxydation von Alkylseitenketten und Reduktion der Nitrogruppe des Phenylrestes.

Der Einsatz von Organophosphaten in der Enzymforschung machte es möglich, Serumesterasen näher zu differenzieren.

1953 stellte Aldridge fest, daß man zwei Typen von Serumesterasen unterscheiden könne. Die von ihm A-Esterasen genannten Enzyme wurden durch E 600 nicht gehemmt; die von E 600 gehemmten Enzyme wurden von ihm B-Esterasen genannt.

Indem selben Jahr (Aldridge 1953_b) wurde die Entdeckung eines Paraoxon hydrolysierenden Enzyms von ihm veröffentlicht, das seiner Meinung nach mit der A-Esterase identisch sei.

Diese als Paraoxonase bezeichnete Enzym katalysiert folgende Reaktion:



Augustinsson und Casida (1959) untersuchten neben der durch die A-Esterase bedingten Spaltung von Phenylestern auch die Hydrolyse der Essigsäureestern des α - und β -Naphtols und des Indoxyls. Aufgrund der Umsetzung dieser Verbindungen und der fehlenden Spaltung von aliphatischen Esterverbindungen und Cholinestern schlugen sie für die A-Esterase, um der Beteiligung der aromatischen Gruppe in den Substraten Rechnung zu tragen, eine neue Bezeichnung vor.

Unter dem Begriff " Arylesterase " grenzten sie die gefundenen enzymatischen Aktivitäten einerseits von den Aliesterasen, durch die aliphatische Verbindungen hydrolysiert werden, andererseits von den Cholinesterasen ab.

Wie sich zeigte, könnte eine Reihe von menschlichen Serum-Arylesterasen unterschieden werden. Eine Aktivität, die sich mittels Elektrophorese darstellen ließ, wanderte mit der Cholinesterase zwischen α_2 und β -Globulinen (Augustinsson 1959), wobei es sich nicht um eine spezielle Arylesterase handeln dürfte, sondern um eine geringe Hydrolysefähigkeit der Cholinesterase für das untersuchte Substrat Phenylacetat. Die andere stärkere Phenylacetat Hydrolysierende Fraktion wanderte mit dem Albumin.

Pilz (1962_a) differenzierte im menschlichen Serum diese Fraktion in die Arylesterase I, welche mit dem Albumin wandert, und in die Arylesterase II, deren Aktivität um mehr als 10-fach niedriger als die von Arylesterase I war, war aber gegen Phosphorsäureester und Prostigmin empfindlich.

Aus weiteren Untersuchungen (Pilz 1962_b) an 70 Probanden zog er den Schluß, daß die Arylesterase I aus mindestens zwei Fermenten bestehen müsse.

1964 wies Pilz mit den Substraten Phenylacetat und β -Naphthylestern 13 Arylesterasen im Nabelschnurserum nach. Dabei unterschied er diese durch Bestimmung des Substrat- und des pH-Optimums, der Hemmbarkeit durch E 600 und dem Umesterungsvermögen. Auf das Umesterungsvermögen der Arylesterasen stieß Pilz, nachdem er 1962 beobachtet hatte, daß in der Gegenwart von Natriumoleat kein β -Naphthol aus β -Naphthylpropionat freigesetzt wurde. Da er eine ähnliche Wirkung (Pilz und Hörlein 1964) auch bei anderen Fettsäuren feststellte, wurden die Reaktionsprodukte dünnschichtchromatographisch untersucht. Durch den Nachweis der Bildung von langkettigen β -Naphthylestern erhielt man den entscheidenden Hinweis, aufgrund dessen man heute die Funktion der Arylesterasen im Fettstoffwechsel sieht.

Durch ihre Fähigkeit der Umesterung haben Arylesterasen wahrscheinlich die Aufgabe, kurzkettige aromatische Estern z.B. das acetylierte Tyrosin des Albumins in Gegenwart langkettiger Fettsäuren umzuestern.

Die Serum-Arylesterasen (E C 3.1.1.2.), für die Pilz et al. (1968) folgende Kriterien definierten:

- Fähigkeit, Tyrosin-O-Ester, nicht aber einwertige Monoester, zu spalten
- Resistenz gegen E 600
- Fähigkeit, langkettige gegen kurzkettige Fettsäuren umzuestern

seien somit ein Co-Fermentenzym der Lipoproteidlipase und dienten zum Transport von freien Fettsäuren (Menzel 1978). Bei den von der International Union of Biochemistry (IUB) unter IC 3.1.1.2. zusammengefaßten Arylesterasen, für die als Hauptreaktion die Spaltung von Phenylacetat mit H_2O zu Phenol und Acetat angegeben ist, wird heute noch als nicht empfohlene Bezeichnung neben " A-Esterase " die Bezeichnung "Paraoxonase" aufgeführt.

Daß es sich dabei wahrscheinlich um nicht identische Enzyme mit unterschiedlicher Spezifität handelt, wurde durch eine Reihe von Arbeiten belegt.

Main gelang 1960 die 330-385fache Anreicherung der Paraoxonase. Dabei besaß das aus Schafsserum gewonnenen Enzympräparat einen Reinheitsgrad von 80-90%. Da das gereinigte Präparat zwar Paraoxon, aber kein Phenylacetat hydrolysierte, Schafsserum aber erwiesenermaßen A-Esterase (Arylesterase) enthält, zweifelte er an der Identität beider Enzyme.

1961 veröffentlichten Erdös und Boggs ihre Entdeckung, daß im menschlichen Serum wahrscheinlich mehrere Enzyme für die Hydrolyse von E 600 existieren. Die in der Cohn'schen Fraktion IV-1 gefundene höhere Aktivität war durch Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) hemmbar. Dabei ist die Wirkung des EDTA durch

seine Fähigkeit, als Chelatbildner mit Metallionen stabile Verbindungen einzugehen, hier aufgrund des Entzugs von Ca^{++} -Ionen zu erklären. Die in der Fraktion V (Albumin) gefundene Restaktivität war in ihrer Funktion unabhängig von Ca^{++} -Ionen, konnte aber durch die Zugabe von Aluminon (Aurintricarbonsäure) völlig ausgeschaltet werden.

Jarczyk (1965), der allerdings mit Präparationen aus den Mitteldärmen von Lepidopteren-Raupen arbeitete, fand zwei für Organophosphate spezifische Enzyme, die sich unterscheiden ließen. Er schlug entsprechend der Klassifizierung der IUB die Schaffung einer neuen Gruppe von Hydrolasen, die der Phosphorsäuretriesterydhydrolasen, vor.

Wichtig für die nähere Charakterisierung der menschlichen Serum-Paraoxonase war das von Krisch (1968) gefundene relativ konstante intraindividuelle, aber variable interindividuelle Verhalten der Paraoxonaseaktivität. Die mit dem von ihm entwickelten Standardtest mit Paraoxon als Substrat, der auch dem experimentellen Teil dieser Arbeit zugrundeliegt, an 50 Probanden gemessenen Aktivitäten lagen zwischen 38 und 190 U/l und wiesen eine doppelgipflige Verteilung auf. Seiner Meinung nach könne der beobachtete Polymorphismus genetisch bedingt sein.

Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1973) fanden durch Messung von 180 menschlichen Seren (bei Werten bis über 500 U/l) allerdings eine dreigipflige Verteilung. Durch die gleichzeitige Entwicklung der Anti-Cholinesterase-Technik, bei der die Restaktivität der Cholinesterase (EC 3.1.1.8.) in Prozent der Ausgangsaktivität nach einstündiger Inkubation mit $3,2 \times 10^{-8} \text{M}$ Paraoxon bestimmt wird, gelang es, einzelne Aktivitäten den 3 Aktivitätstypen eindeutig zuzuordnen. Dabei stellte sich heraus, daß die mit der Anti-Cholinesterase-Technik gemessenen Werte mit den nach Krisch (1968) ermittelten Paraoxonaseaktivitäten mit $r = 0,82$ (bei $n = 50$) korrelierten.

Die genetische Determiniertheit der Paraoxonase wurde mit dieser Technik von Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1975) an 35 Familien mit 52 Kindern untersucht, wobei die Vererbung der 3 unterscheidbaren Gruppen in jedem Fall ohne Ausnahme einem einfachen 2-Allele-Modell folgte.

Eine weitere Bestätigung der dreigipfligen Verteilung der menschlichen Serum-Paraoxonase lieferte Dumbach (1976).

In einer retrospektiven Auswertung verglich er die Verteilung von 180 nach Krisch (1968) erhaltenen Werte mit den Ergebnissen von Zech und Zürcher (1974), die 619 menschlichen Seren mit einer eigenen spektrophotometrischen Methode bestimmt und ihre Verteilung als bimodal interpretiert hatten.

Beide Verteilungen waren fast identisch, in beiden ließen sich drei Gruppen erkennen. Als wahrscheinliche Gruppengrenzen haben Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. 1973 zwischen niedriger und mittlerer Aktivität 190 U/l und zwischen mittlerer und hoher Aktivität 350 U/l angegeben.⁺⁺

Ebenso wurde in einer Publikation von Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. von 1979 die trimodale Verteilung bei 799 mit der Anti-Cholinesterase-Technik bestimmten Seren nach logistischer Transformierung nach Koller (1955) gesichert. Dabei konnten allerdings die enzymatischen Aktivitäten der einzelnen Seren nicht immer den drei Aktivitätstypen eindeutig zugeordnet werden. Vielmehr fand sich auch hier eine Mischverteilung, bei der über die Zugehörigkeit individueller Werte zu einer der drei Gruppen nur die Angabe von Wahrscheinlichkeit möglich ist. Gleichzeitig bestätigte die statistische Auswertung von Untersuchung an 99 Familien mit insgesamt 180 Kindern die angenommene Vererbungsverhalten (2-Allele-Modell mit autosomal-intermediärem Erbgang), wobei das Ergebnis exakt mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz übereinstimmte.

⁺⁺ Durch neuere noch unveröffentlichte Untersuchungen eines großen westdeutschen Kollektivs (Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. 1983) kann heute ein erster Einschnitt einer Verteilung bei etwa 100 U/l angenommen werden

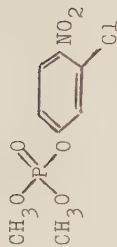
Mit Hilfe des als statistisch gesichert geltenden Polymorphismus konnte die Substratspezifität näher bestimmt werden. So beschrieben Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. 1973 die menschliche Serum-Paraoxonase als ein sehr spezifisches Enzym, dem weder die Spaltung von Phenylacetat (Simpson fand hier 1971 eine unimodale Verteilung), noch die von p-Nitrophenylphosphat zuzuschreiben sei.

Die nähere Untersuchung an anderen Organophosphat-Derivaten zeigten, daß zwar unter den angegebenen Versuchsbedingungen (Krisch 1968) Methyl-Paraoxon bzw. Chlor-Methyl-Paraoxon, ebenso wie Paraoxon (der Korrelationskoeffizient betrug 0,965 bzw. 0,90) gespalten wurde, bei Chlor-Methyl-Paraoxon allerdings der Aktivitätsbereich von beiden Seiten eingeschränkt war (Formelbilder siehe Abbildung 1).

Keine Spaltung erfolgte dagegen bei Parathion, Methyl-Parathion und Chlorthion, alles Verbindungen, an denen der Sauerstoff am Phosphat durch Schwefel ersetzt ist. Genausowenig wurden Mono-Desmethyl-Paraoxon, p-Nitrophenyl-Phosphat, iso-Propyl-Paraoxon sowie die beiden Paraoxon-Derivaten ortho- und meta-nitro-Paraoxon, deren Nitrogruppe am Nitrophenylrest nicht in para-Stellung steht, durch die Paraoxonase gespalten (Formelbilder siehe Abbildung 2). Das zusätzlich in Abbildung 1 dargestellte n-Propyl-Paraoxon wurde unter den angegebenen Versuchsbedingungen durch menschliches Serum unter Abspaltung des aciden Restes umgesetzt. Wahrscheinlich ist dessen Hydrolyse, für die sich kein dem Paraoxon entsprechender Polymorphismus nachweisen ließ, jedoch kein Resultat einer Spaltung durch die Paraoxonase. Dafür sprechen auch die Ergebnisse, die Flügel und Geldmacher-v.Mallinckrodt (1978) aus den Experimenten zur Kinetik mit je zwei Seren niederer, mittlerer und hoher Paraoxonase-Aktivität erhielten. So war die Michaeliskonstante des n-Propyl-Paraoxon spaltenden Enzyms für alle sechs Seren gleich und lag um mehr als 10^{-1} niedriger als



PARAOXON



PO-CHLOROTHION $r=0,90$



METHYL-PARAOXON $r=0,965$



n-PROPYL-PARAOXON

Abb. 1: Durch menschliches Serum gesaltene Substrate. Wahrscheinlich wird n-Propyl-Paraoxon nicht durch die Paraoxonase umgesetzt (siehe nähere Beschreibung im Text; nach Geldmacher-v.Mallinkrodt et al. 1973)

$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array} \text{P}(=\text{S})(\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ PARATHION	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{P}(=\text{O})(\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ ISOPROPYL-PARAOXON	$\text{CH}_3\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ MONO-DESMETHYL-PARAOXON
$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{O} \\ \text{CH}_3\text{O} \end{array} \text{P}(=\text{S})(\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ METHYL-PARATHION	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array} \text{P}(=\text{O})(\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ M-NITRO-PARAOXON	$\text{HO}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ DI-DESMETHYL-PARAOXON
$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{O} \\ \text{CH}_3\text{O} \end{array} \text{P}(=\text{S})(\text{Cl})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ CHLOROTHION	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array} \text{P}(=\text{O})(\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)\text{Cl}$ O-NITRO-PARAOXON	$\text{CH}_3\text{CO}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$ PHENYLACETAT (SIMPSON 1971)

Abb. 2: Zusammenstellung der von der menschlichen Serum-Paraoxonase nicht gespaltenen Substrate (nach Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. 1973)

die vergleichbaren Werte der Paraoxonase für die Hydrolyse des E 600. Dagegen wurden für die verschiedenen hohen Aktivitäten der Paraoxonase jeweils unterschiedliche Michaeliskonstanten ermittelt. Die einzelnen K_m -Werte betrugen $3,19$ und $3,29 \times 10^{-4}$ für zwei Seren mit hoher Aktivität, $6,46$ und $8,06 \times 10^{-4}$ für zwei Seren mit mittlerer und $12,44$ und $18,30 \times 10^{-4}$ für zwei Seren mit niederer Aktivität.

Durch neuere Untersuchungen (z.B. Wambach 1980) ist es wahrscheinlich, daß allein der zuerst von Erdös und Boggs (1961) differenzierte EDTA-hemmbarer Anteil der Paraoxonase-Aktivität für die unterschiedlichen Aktivitäten des Enzyms verantwortlich ist. Neben der Tatsache, daß es zwei Fermente gibt, die sich aufgrund ihrer EDTA-Hemmbarkeit und ihrer unterschiedlichen Fraktionierung unterscheiden lassen, stellt sich die Frage, ob der Polymorphismus des EDTA-hemmbareren Anteils rein quantitativ oder qualitativ durch die unterschiedlichen Strukturen der Enzyme, im Sinne von Iso-Enzymen, begründet ist; die gefundenen unterschiedlichen Michaeliskonstanten sprechen für das letztere.

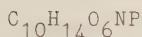
2. P R O B L E M S T E L L U N G

Zur weiteren Abgrenzung der Substratspezifität soll in dieser Arbeit p-Nitrophenylacetat als Substrat bezüglich seiner Hydrolyse durch das menschliche Serum nach Krisch (1968) untersucht werden. Dadurch soll einer möglichen Charakterisierung und Hinweisen auf die molekularen Verhältnisse der im menschlichen Serum befindlichen Paraoxonase nähergekommen werden. Als Kriterium der Identität wird der bei der menschlichen Serum-Paraoxonase gesicherte Polymorphismus verwendet. Zu diesem Zweck sollen die Seren von 50 Probanden (Europäer, Spender der Blutbank von Erlanger-Universitätsklinik, Zufallsauswahl) mit den zu untersuchenden Substraten auf ihre Hydrolysefähigkeit geprüft werden.

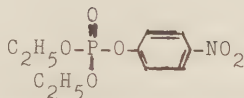
Um ein besseres Verhältnis zwischen der serumbedingten Hydrolyse und dem Spontanzerfall zu erreichen, wurde der pH-Wert variiert. Dabei fand sich bei pH 7,0 eine für die beiden Fällen günstigere Relation. Diese Verschiebung des pH-Wertes machte es jedoch nötig, eine zusätzliche Bestimmung der Hydrolyse von Paraoxon bei pH 7,0 durchzuführen. Dadurch sollte geprüft werden, ob eine Veränderung des Polymorphismus der Paraoxonase-Aktivität unter diesen Bedingung erfolgt.

3. BESCHREIBUNG DER VERWENDETEN SUBSTRATE

3.1. PARAOXON



Mol 275,19



O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenylphosphat

Das 1944 von Schrader synthetisierte E 600 besitzt ausgezeichnete insektizide und akarizide Wirkung. Die hohe Warmblütertoxizität zog der praktischen Anwendung als Systeminsektizide enge Grenzen.

Chemische Eigenschaften

Paraoxon ist formal ein Triester der Phosphorsäure. Da die Hydroxygruppe des im Paraoxon gebundenen p-Nitrophenol, verstärkt durch das Vorhandensein der Nitrogruppe, saure Eigenschaft besitzt (pKa bei 25°C: 7,15), kann Paraoxon auch als gemischte Säure aufgefaßt werden. Nach Schrader (1963) ist E 600 gerade durch diese Tatsache gegenüber hydrolytischen Einflüssen besonders empfindlich. So beträgt die Dauer einer 50%-igen Verseifung (bei 37°C) von Paraoxon 12,3 Tage, dagegen benötigt die 50%-ige Hydrolyse des Derivats ohne Nitrogruppe 3008 Tage. Gleichzeitig ist die hydrolytische Beständigkeit des Paraoxon pH-Wert-abhängig. E 600 unterliegt bei höherem pH-Wert einem stärkeren hydrolytischen Zerfall.

Physikalische Eigenschaften

Der Wirkstoff Paraoxon ist in reinem Zustand ein farbloses, kaum riechendes Öl. Die Viskosität bei 25°C: 15,86 Centipoise; d_4^{20} : 1,2667; n_D^{20} : 1,5130. In den meisten organischen Lösungsmitteln löst sich Paraoxon leicht. In Petroläther und Paraffinöl löst es sich nur wenig. Die Löslichkeit in H₂O bei 25°C beträgt 2,4 g/l.

Über die Siedepunkte, Dampfdruck und die Feuchtigkeit unterrichtet die nachstehende Tabelle:

Kp		P		V	
0,01 mmHg	88°C	0°	$7,5 \times 10^{-7}$ mmHg	0,012	mg/cbm
0,03 mmHg	100°C	10°	$3,7 \times 10^{-6}$ mmHg	0,05	mg/cbm
0,05 mmHg	107°C	20°	$1,2 \times 10^{-5}$ mmHg	0,18	mg/cbm
0,1 mmHg	118°C	30°	4×10^{-5} mmHg	0,58	mg/cbm
0,2 mmHg	127°C	40°	$1,2 \times 10^{-4}$ mmHg	1,7	mg/cbm
0,4 mmHg	138°C	50°	$3,5 \times 10^{-4}$ mmHg	4,8	mg/cbm
0,6 mmHg	144°C				
0,8 mmHg	149°C				

Bei starkem Sonnenlicht wird Paraoxon in eine dunkle, teilweise zersetzte Flüssigkeit umgewandelt.

Die Hydrolysedaten von Paraoxon bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen pH-Werten gehen aus den nachstehenden Zahlen hervor:

Temperatur	50%-ige Verseifung in Tagen (gemessen in pH-Bereich 1-5)						
	10°	20°	30°	40°	50°	60°	70°
Paraoxon	1200	320	93	29	9,6	3,2	1,2

pH	50%-ige Verseifung in Stunden (gemessen bei 70°C)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Paraoxon	18,5	22,7	23	24,4	24,4	18	11,5	9,2	2,1

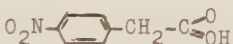
Paraoxon ist also im saurem Gebiet gegen hydrolytische Einflüsse relativ beständig (G. Schrader).

3.2. p - N I T R O P H E N Y L A C E T A T

Synonyma: 4-nitrophenylacid, 4-Nitropheylelessigsäure.

p-Nitrophenylelessigsäure ist eine organische Säure, die in Form hellgelber Nadeln im Handeln erhältlich ist und deren Löslichkeit im Wasser gering, im Alkohol, Ether und Benzol gut ist.

Chemische Formel: $C_8H_7O_4N = O_2N.C_6H_4.CH_2.CO_2H$

Struktur-Formel: 

Das Molekulargewicht beträgt 181,15

p-Nitrophenylelessigsäure findet sich im Harn von Menschen, Kaninchen und Hunden nach Verabreichung von 4-Nitrophenylacetaldehyd; p-Nitrophenylelessigsäure wird im Organismus von Menschen, Hunden und Kaninchen nicht verändert. Darstellung durch Kochen von 4-Nitro-benzylcyanid mit 70%-iger Schwefelsäure (Robertson, Stieglitz, Am. Soc 43,180)

Die Oberflächenspannung der gesättigten wäßrigen Lösung wird bei 22-25°C erreicht.

(Beilstein 19)

4. M E T H O D I K

Zur Messung der im menschlichen Serum vorhandenen Aktivität bei Spaltung der eingesetzten Substrate wurde der für die Hydrolyse von E 600 (Paraoxon) durch Krisch (1968) entwickelte Test zugrundegelegt. Bei dieser Methode wird im fortlaufenden spektrophotometrischen Test das in 0,1 M Glycin-Natronlauge-Puffer von pH 11,2 aus Paraoxon abgespaltene p-Nitrophenol gemessen.

4.1. M E S S U N G D E R P A R A O X O N A S E - A K T I V I T Ä T N A C H K R I S C H (1 9 6 8)

L Ö S U N G E N

0,1 M Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2) nach Sörensen

3,784 g Glycin und 2,945 g NaCl abwiegen, etwa 850 ml H₂O-bidest zugeben.

Unter ständigem Rühren mit 1,0 N NaOH (40,0 g NaOH mit H₂O-bidest ad 1,0 l) auf pH 11,2 einstellen. Dann die Lösung mit H₂O-bidest auf fast 1,0 l auffüllen und bei $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ den pH-Wert kontrollieren und evt. korrigieren. Anschließend wird mit H₂O-bidest auf 1,0 l aufgefüllt.

Tris-HCl-Puffer (pH 8,0)

12,114 g Tris-hydroxymethyl-amino-methan abwiegen und in etwa 850 ml H₂O-bidest lösen.

Unter vorsichtiger Zugabe von 1,0 N HCl auf pH 8,0 einstellen. Weiter wird wie oben verfahren.

E 600-Stammlösung

($1,2 \times 10^{-2}\text{M}$ in 0,1 M Trispuffer von pH 8,0)

0,26 ml E 600 (Paraoxon) in 100 ml Trispuffer (pH 8,0) geben. Da hierbei 3,302 g auf 1,0 l gelöst werden und die Löslichkeit von Paraoxon in H₂O (bei 25°C : 2,4 g je Liter H₂O) überschritten ist, muß die übersättigte Lösung vor Ansetzen der Ge-

brauchslösung durch Mischen im Ultraschallbad emulgiert werden.

E 600-Gebrauchslösung

Die E 600-Stammlösung wird zum Gebrauch jeweils 1 : 5 mit H₂O-bidest verdünnt.

Serum-Verdünnung

Für die Bestimmung wird das Serum jeweils 1 : 5 mit 0,9%-iger Kochsalzlösung (9,0 g NaCl mit H₂O bidest ad 1,0 l) verdünnt. Die Gebrauchslösungen werden in den benötigten Mengen in den Reagenzgläsern im Wasserbad bei $t = 25^{\circ}\text{C}$ inkubiert, bis sie die Temperatur t erreicht haben.

Ansatz ($t = 25^{\circ}\text{C}$)

Von den im Wasserbad befindlichen Reagenzgläsern werden pipetiert in der angegebenen Reihenfolge und in ein Reagenzglas zusammengebracht:

3,3 ml Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
0,5 ml 1 : 5 verdünntes Serum
1,0 ml E 600-Gebrauchslösung

Nach dem Durchmischen (das Ansatzreagenzglas wird kräftig mit der Hand geschüttelt) wird ein Teil der Ansatzlösung in eine Küvette (Schichtdicke 1 cm) eingegossen.

Messung

Nach Einbringen der Küvette in das Photometer wird die Extinktion bei Wellenlänge 405 nm und $t = 25^{\circ}\text{C}$ abgelesen.

Ausgewertet wird die Extinktionsdifferenz ($E_{180\text{s}} - E_{30\text{s}}$). Von dem Messwert wird der unter entsprechenden Bedingungen gemessene Spontanzerfall (Leerwert, für den anstatt Serum kommt in die Ansatzlösung 0,5 ml 0,9%-ige Kochsalzlösung) abgezogen.

N.B. : Bei diesem Versuch werden die jeweiligen Leerwerte durch das Digital-Photometer direkt abgezogen, so daß man bei der Ermittlung der jeweiligen Aktivitäten direkt von den einzelnen abgelesenen Extinktionsdifferenzen ausgehen darf.

Berechnung

Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenz in nMol/l wird der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer bei pH 11,2) bei 405 nm, nämlich $18,05 \times 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{Mol}^{-1}$ zugrundegelegt.

10 nMol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätte demnach bei $d = 1 \text{ cm}$ und $\lambda = 405 \text{ nm}$ eine Extinktion von 0,1805.

Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung auf 1 ml Serum durch Multiplikation mit 10), der Meßzeit (Umrechnung auf 1 min durch Division mit 2,5) und des Ansatzvolumens (= 4,8 ml, also Multiplikation mit 4,8) errechnet sich die Aktivität nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität} = \frac{E \times 10 \times 4,8 \times 10}{0,1805 \times 2,5}$$

$$\underline{\text{Aktivität} = E \times 1063 \text{ (U/l)}}$$

4.2.1. Berechnung der äquivalenter Menge von p-Nitrophenylacetat

In E 600-Stammlösung ist 0,26 ml E 600 in 100 ml Trispuffer gelöst.

0,26 ml E 600 ($d_4^{20} = 1,2667$) wiegt 0,32934 g

0,32934 g E 600 ergibt 0,00119 Mol E 600

0,00119 Mol p-Nitrophenylacetat (MG = 181,15)

ergibt demnach 0,21679 g p-Nitrophenylacetat.

4.2.2. Auswahl des pH-Wertes

Die Vorversuche mit p-Nitrophenylacetat, in adäquater Menge in einem bestimmten Volumen von Trispuffer gelöst, unter Änderungen des pH-Wertes haben gezeigt, daß der hydrolytischer Zerfall von p-Nitrophenylacetat in saurem Bereich (bei pH-Werten unter 7) gering ist, erkennbar an einer sehr geringer Extinktion und diese änderte sich im Laufe der Zeit auch kaum, während deren hydrolytischer Zerfall in basischem Bereich zu stark ist, erkennbar an hoher Extinktion schon in der 1. Minute. Unter Berücksichtigung der Spaltung von Paraoxon bei pH 7,0, die auch in diesem Versuch ermittelt wurde, ist man auf den pH 7,0 gekommen, der unter diesen Versuchsbedingungen als der optimale erschien (die spontane Hydrolyse ist gering, die Entfaltung der Enzymaktivität ist relativ gut).

Die Zeit-Extinktion-Kurven in Abb. 3_a und 3_b zeigen den zeitlichen Verlauf der Spaltung von p-Nitrophenylacetat und Paraoxon bei einem pH-Wert von 7 durch das menschliche Serum, wobei der annähernd geradliniger Verlauf beider Kurven auf die stabile und konstante Spaltung beider Substrate durch das menschliche Serum hindeutet.

Abb. 3a

Zeit-Extinktion-Kurve
von p-Nitrophenylacetat
(pH 7,0)

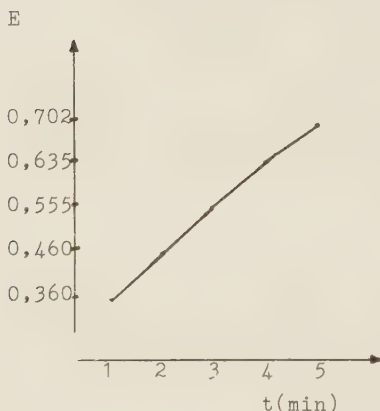
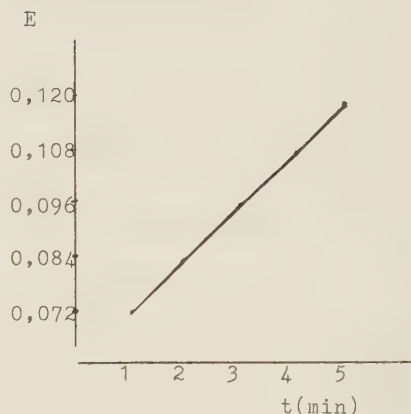


Abb. 3b

Zeit-Extinktion-Kurve
von Paraoxon (pH 7,0)



Herstellung von p-Nitrophenylacetat-Stammlösung

0,21679 g p-Nitrophenylacetat in 100 ml Trispuffer von pH 7,0 (Herstellung von Trispuffer wie auf der Seite 18, nur hier unter Zugabe von 1,0 N HCl statt auf pH 8,0 auf pH 7,0 einstellen) geben. Nach kräftigem Schütteln in einem verschlossenen Kolben mußte die Lösung in einem Kühlschrank aufbewahrt werden (Schutz vor einem spontanen Zerfall durch die Wärme). Vor dem Ansetzen der Gebrauchslösung mußte die Lösung zuerst in ein Ultraschallbad zur Emulsion gebracht werden.

Herstellung von p-Nitrophenylacetat-Gebrauchslösung

Nach der Emulsion in einem Ultraschallbad wird die p-Nitrophenylacetat-Stammlösung zum Gebrauch jeweils 1:5 mit Aquabidest verdünnt.

4.3. ABÄNDERUNG DER VERSUCHSAN- LEITUNG NACH KRISCH (1968)

Wegen der Bestimmung der p-Nitrophenylacetat-Spaltung durch menschliches Serum bei pH 7,0 und der dadurch notwendigen Bestimmung der Paraoxon-Spaltung unter den gleichen Bedingungen ist es erforderlich, die Versuchsanleitung nach Krisch (1968) abzuändern.

Statt des 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2) nach Sørensen nimmt man den Tris-Hcl-Puffer mit pH 7,0 (Herstellung siehe S. 22 und 18).

Durch die pH-Wert-Änderung erfährt der Aktivitätsfaktor von Krisch (1968) eine Änderung, die man wie folgt berechnet: Man nimmt die Substanz p-Nitrophenol, wiegt sie in der Menge 0,5 mg - 1,0 mg - 1,5 mg und löst sie einzeln in die Pufferlösungen von pH 7,0 und 11,2.

Aus den Versuchsreihen ergaben sich :

Bei pH 7,0 :

0,5 mg p-Nitrophenol in 100 ml Pufferlösung gelöst
ergab eine Extinktion von $E = 0,450$
1,0 mg p-Nitrophenol in 100 ml Pufferlösung gelöst
ergab eine Extinktion von $E = 0,860$
1,5 mg p-Nitrophenol in 100 ml Pufferlösung gelöst
ergab eine Extinktion von $E = 1,285$

Bei pH 11,2:

0,5 mg p-Nitrophenol in 100 ml Pufferlösung gelöst
ergab eine Extinktion von $E = 0,730$
1,0 mg p-Nitrophenol in 100 ml Pufferlösung gelöst
ergab eine Extinktion von $E = 1,420$
1,5 mg p-Nitrophenol in 100 ml Pufferlösung gelöst
ergab eine Extinktion von $E = 2,000$

Daraus folgt:

Der Umrechnungsfaktor bei 0,5 mg Substanz (F) = 0,616

Der Umrechnungsfaktor bei 1,0 mg Substanz (F) = 0,605

Der Umrechnungsfaktor bei 1,5 mg Substanz (F) = 0,642

Der Mittelwert für den Umrechnungsfaktor F beträgt demnach 0.621.

So ist der Aktivitätsfaktor zur Berechnung der Aktivität von menschlichen Seren bei der Spaltung der genannten Substrate bei pH 7,0 $F = 0,621 \times 1063$

Die Aktivität des menschlichen Serum selber errechnet sich aus der Formel:

$$A = \frac{E \times 0,621 \times 1063}{(U/l)}$$

4.4. Präzisionsbestimmungen

Für die Präzisionsbestimmung wurden als Stichproben die Extinktionsdifferenzen der jeweiligen Messungen herangezogen. Bei diesem Versuch wurde wegen des langsamen zeitlichen Verlaufes der Substratspaltung die Extinktionsdifferenz zwischen der 1. und 5. Minute ermittelt.

Es wurden für einen Substrat insgesamt 12 Messungen vorgenommen.

1. Präzisionsbestimmung bei der Spaltung von Paraoxon durch menschliches Serum bei pH 7,0

Probe-Nr.	E(5 min - 1 min)	Aktivität (U/l)
01	0,073	77,599
02	0,073	77,599
03	0,071	75,473
04	0,071	75,473
05	0,073	77,599
06	0,073	77,599
07	0,073	77,599
08	0,073	77,599
09	0,072	76,536
10	0,072	76,536
11	0,071	75,437
12	0,072	76,536

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$= \frac{919,495}{12}$$

$$\bar{x} = 76,624 \text{ U/l}$$

$\bar{x}$ = der Mittelwert

x_i = die einzelnen Aktivitäten

n = die Anzahl der Aktivitäten

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$= \sqrt{\frac{14,576}{11}}$$

$$= \sqrt{1,325}$$

$$s = 1,151$$

s = Standardabweichung

$$v = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \%$$

$$= \frac{1,151}{76,624} \times 100 \%$$

$$v = 1,502 \%$$

v = Variationskoeffizient

2. Präzisionsbestimmung bei der Spaltung von p-Nitrophenylacetat durch menschliches Serum bei pH 7,0 ($n = 12$)

Probe-Nr.	E(5 min - 1 min)	Aktivität (U/l)
01	0,356	378,428
02	0,348	369,924
03	0,354	376,302
04	0,352	374,176
05	0,342	363,546
06	0,357	379,491
07	0,354	376,302
08	0,356	378,428
09	0,365	387,995
10	0,362	384,806
11	0,350	372,050
12	0,353	375,239

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$\bar{x}$ = der Mittelwert
 x_i = die einzelnen Aktivitäten
 n = die Anzahl der Aktivitäten

$$= \frac{4516,787}{12}$$

$$\bar{x} = 376,398 \text{ U/l}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

s = die Standardabweichung

$$= \sqrt{\frac{455,238}{11}}$$

$$= \sqrt{41,385}$$

$$s = 6,433$$

$$v = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \%$$

v = der Variationskoeffizient

$$= \frac{6,433}{376,398} \times 100 \%$$

$$v = 1,709 \%$$

4.5. Analytisches Vorgehen

Für jede der 50 Versuchsreihen mit den Seren aus der Blutbank der Erlanger Universitätsklinik (deutsche Probanden) wurden 3 Messungen gemacht : 1. Standardmessung nach Krisch (1968)
 2. Messung der Paraoxon-Spaltung durch menschliches Serum bei pH 7,0 und 3. Messung der p-Nitrophenylacetat-Spaltung durch menschliches Serum bei pH 7,0

Zu jeder Versuchsreihe sind dann 3 Testansätze anzufertigen:

1. Ansatz (Standard-Ansatz nach Krisch 1968)

In ein im Wasserbad ($t = 25^{\circ}\text{C}$) befindliches Reagenzglas wurden pipettiert :

3,3 ml Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)

0,5 ml mit NaCl 1:5 verdünntes Serum

und kurz vor Messung 1,0 ml E 600-Gebrauchslösung

Nach Durchmischen des Ansatzes wurde ein Teil der Lösung in eine Küvette ($d = 1 \text{ cm}$) eingegossen und dann die Küvette in den Photometer zur Messung der Extinktionen gebracht.

Es wurden die Extinktionen nach 30 und 180 Sekunden abgelesen. Weil der Reaktionsablauf mit einem Digital-Photometer ermittelt und der Leerwert beglichen wurde, konnte bei der Berechnung auf das Abziehen des Leerwertes verzichtet werden.

2. Ansatz

In ein im Wasserbad ($t = 25^{\circ}\text{C}$) befindliches Reagenzglas wurden pipettiert:

3,3 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7,0)

0,5 ml mit NaCl 1:5 verdünntes Serum

und kurz vor Messung 1,0 ml E 600-Gebrauchslösung.

Weiterhin wie beim 1. Ansatz verfahren.

3. Ansatz

In ein im Wasserbad befindliches Reagenzglas (auf 25°C inkubiert) wurden pipettiert:

3,3 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7,0)

0,5 ml mit NaCl 1:5 verdünntes Serum

und kurz vor Messung 1,0 ml p-Nitrophenylacetat-Gebrauchslösung

Weiterhin wie oben verfahren.

5. E R G E B N I S S E

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der jeweiligen Hydrolyse der Substrate durch die Seren von 50 zufällig ausgewählten Probanden (Blutspender der Erlanger Blutbank) zusammengestellt.

Tab. 2: Zusammenstellung der ermittelten Aktivitäten in U/l von 50 zufällig ausgewählten Probanden für die Substrate Paraoxon bei pH 11,2, sowie für Paraoxon bei pH 7,0 und p-Nitrophenylacetat bei pH 7,0

Probe- Nummer	Geschlecht	Alter	Paraoxon pH 11,2	Paraoxon pH 7,0	p-Nitrophe- nylacetat pH 7,0
01	männlich	36	52	15	226
02	"	42	238	73	519
03	"	25	62	11	299
04	"	31	63	14	352
05	"	43	57	12	344
06	weiblich	25	60	12	238
07	männlich	42	185	51	407
08	weiblich	42	132	43	348
09	männlich	35	47	6	170
10	"	26	164	64	350
11	"	51	149	60	394
12	weiblich	51	137	46	284
13	männlich	26	38	10	233
14	"	19	31	12	235

Probe- Nummer	Geschlecht	Alter	Paraoxon pH 11,2	Paraoxon pH 7,0	p-Nitrophe- nylacetat pH 7,0
15	weiblich	33	43	52	312
16	"	33	47	16	255
17	männlich	28	55	22	234
18	"	34	25	16	200
19	weiblich	28	68	73	260
20	männlich	29	72	53	239
21	"	22	112	70	256
22	"	40	82	56	253
23	"	44	52	19	213
24	"	29	48	10	156
25	"	46	207	99	440
26	"	28	410	190	698
27	"	58	34	15	289
28	"	31	181	97	434
29	"	30	43	19	309
30	"	21	93	37	251
31	"	27	121	53	256
32	weiblich	40	108	46	245
33	"	37	24	15	206
34	männlich	30	91	27	386
35	weiblich	21	73	24	370
36	männlich	25	187	63	398
37	"	43	194	66	405
38	"	48	191	70	398
39	"	47	211	61	439
40	"	29	202	60	466

Probe- Nummer	Geschlecht	Alter	Paraoxon pH 11,2	Paraoxon pH 7,0	p-Nitrophe- nylacetat pH 7,0
41	weiblich	20	45	6	253
42	männlich	22	219	65	454
43	"	29	47	6	259
44	"	24	81	17	386
45	"	26	245	83	515
46	weiblich	25	83	18	405
47	männlich	26	103	22	456
48	"	21	88	16	346
49	"	31	66	14	355
50	"	26	585	193	528

6. A U S W E R T U N G

Die beobachteten enzymatischen Aktivitäten der menschlichen Seren bei der Hydrolyse der in dieser Arbeit experimentell untersuchten Substrate wurden mit Hilfe beschreibender Statistik und statistischer Tests ausgewertet.

6.1. A U S W E R T U N G D E R H Y D R O L Y S E V O N P A R A O X O N (bei pH 11,2 und pH 7,0)

Die einzelnen für die Hydrolyse von Paraoxon bei pH 11,2 und pH 7,0 gemessenen Werte können aus der Tabelle 2 entnommen werden.

Die bei pH 11,2 (Standard-Test nach Krisch 1968) gemessenen Aktivitäten lagen zwischen 24 und 585 U/l. Das entsprechende Histogramm ist in der Abbildung 4 dargestellt.

Bei Annahme der oberen Grenze des niederen Aktivitätstypes bei circa 100 U/l (siehe Fußnote Seite 9) und der unteren Grenze des hohen Aktivitätstypes bei circa 350 U/l waren 29 Werte von niederer Aktivität, 19 Werte von mittlerer Aktivität, davon 13 zwischen 149 und 245 U/l, und nur 2 Werte von hoher Aktivität.

Die Messungen der Hydrolyse von Paraoxon durch menschliches Serum bei pH 7,0 ergaben Werte zwischen 6 und 193 U/l. Das entsprechende Histogramm ist in der Abbildung 5 zu sehen. Die Zugehörigkeit der einzelnen Aktivitäten in einem der 3 Aktivitätstypen der Hydrolyse von Paraoxon bei pH 11,2 ist durch die Markierung erkennbar.

Für die statistische Überprüfung des linearen Zusammenhanges der jeweiligen Wertepaare erfolgte die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach der Pearson-Formel. Dieser war $r = 0,915$ und ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1,0 % hochsig-

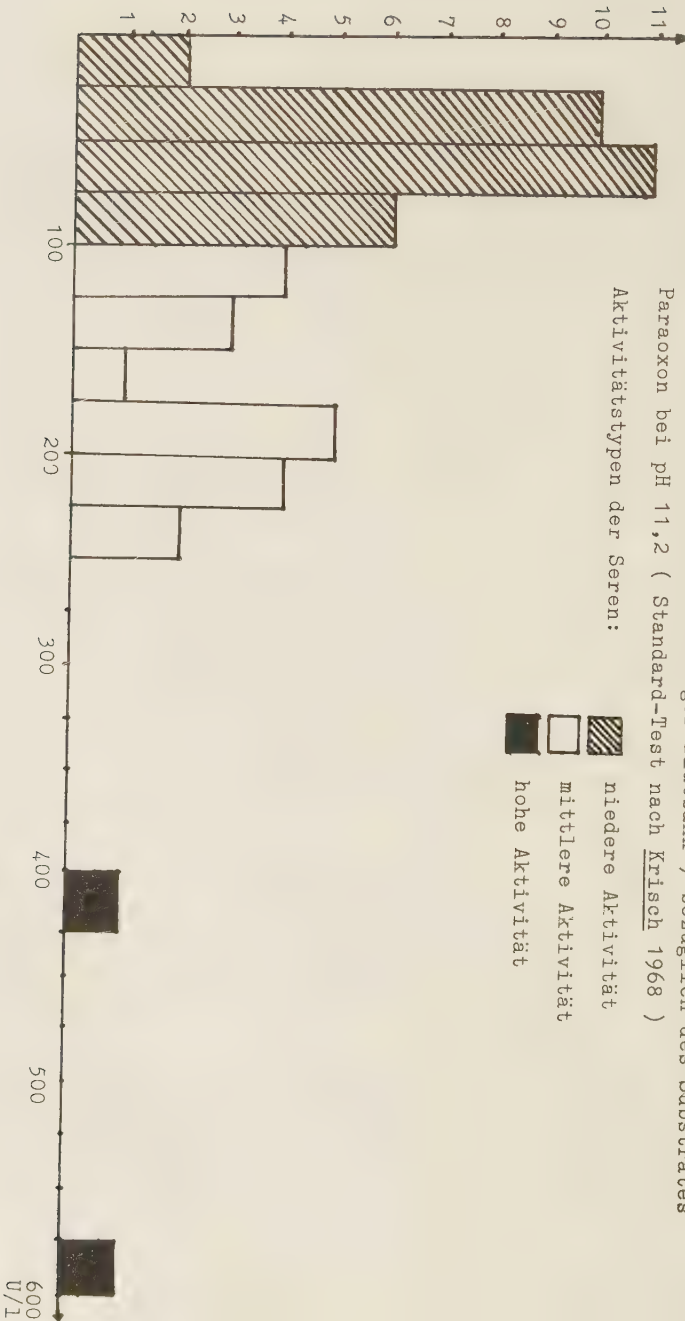
Anzahl der
Probanden

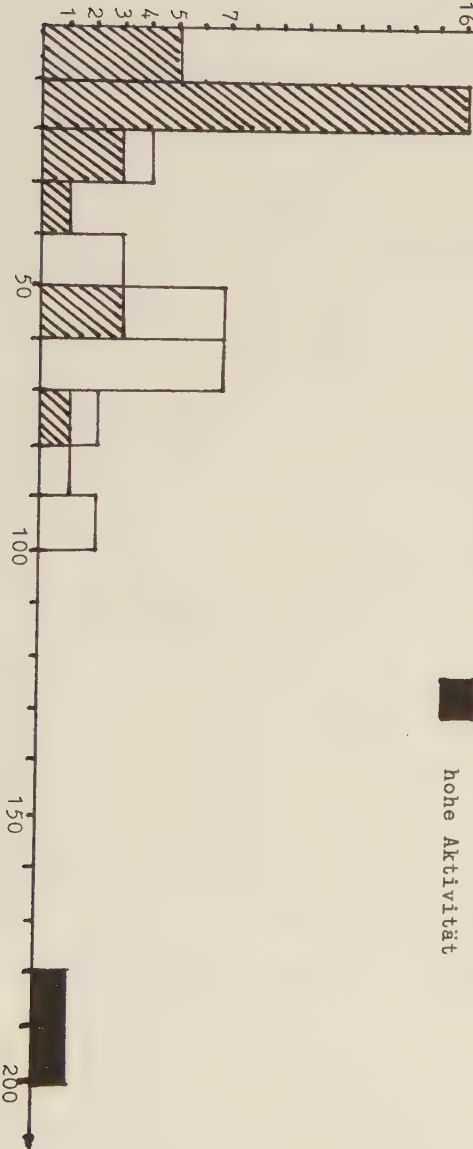
Abb.4:

Histogramm der Aktivitätsverteilung von 50 menschlichen Seren
(Zufallsauswahl aus der Erlanger Blutbank) bezüglich des Substrates
Paraoxon bei pH 11,2 (Standard-Test nach Krisch 1968)

Aktivitätstypen der Seren:

-  niedrigere Aktivität
-  mittlere Aktivität
-  hohe Aktivität





nifikant von Null verschieden.

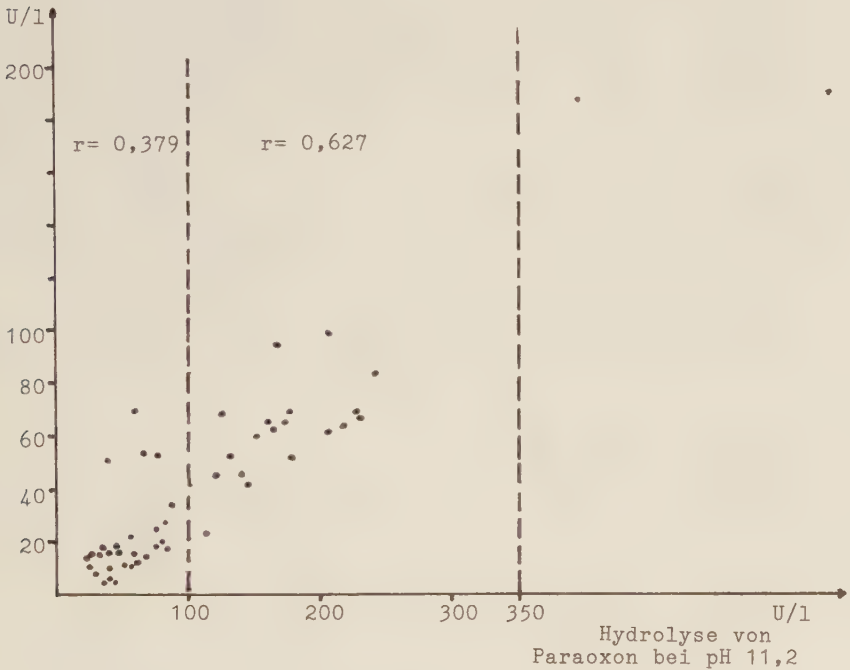
Die gleichzeitige graphische Auftragung jedes einzelnen Aktivitätspaares der 50 Seren in einem Korrelogramm ließ einen deutlichen Hinweis auf einen linearen Zusammenhang erkennen (Abbildung 6).

Durch die Änderung des pH-Wertes bleiben die Seren der einzelnen Aktivitätstypen auch weiterhin als solche erkennen, innerhalb der Wertepaare des niederen Aktivitätstypes jedoch ist der Zusammenhang nicht erkennbar. So betrug der Korrelationskoeffizient der 29 niederaktiven Wertepaare $r = 0,38$. Die Bestimmung eines Zusammenhanges für die Variablenpaare des mittleren Aktivitätstypes ($n = 19$) ergab dagegen einen Korrelationskoeffizienten von $0,63$, der bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $1,0\%$ einen signifikant von Null verschiedenen Wert darstellt.

Auf eine Auswertung der Wertepaare des hohen Aktivitätstypes wurde aufgrund der geringen Fallzahl ($n = 2$) verzichtet. Somit zeigte sich der Vergleich der Hydrolyseaktivität von 50 menschlichen Seren bei zwei verschiedenen pH-Werten, was auch Krisch 1968 bei der Bestimmung des pH-Optimums fand, daß bei niedrigeren pH-Werten die jeweilige Aktivität der einzelnen Seren abnimmt. Zusätzlich konnte gesichert werden, daß sich der typische Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase kaum verändert; nur innerhalb der Gruppe der niederen Aktivität, wahrscheinlich auch aufgrund der geringen Aktivitätsunterschiede und die Meßungenauigkeiten bedingt, ließ sich der Zusammenhang nicht eindeutig nachweisen.

Abb.6: Korrelogramm der Hydrolyse von Paraoxon durch menschliche Seren bei pH 11,2 und 7,0. Der Korrelationskoeffizient der gesamten Variablenpaare beträgt 0,915. Die Punktwolke ist unterteilt, ausgehend von den Aktivitätstypen bei der Hydrolyse von Paraoxon bei pH 11,2. Mitangegeben sind die Korrelationskoeffizienten der Wertepaare von dem niederen und mittlerem Aktivitätstyp.

Hydrolyse von
Paraoxon bei pH 7,0



6.2. AUSWERTUNG DER HYDROLYSE VON p - NITROPHENYLACETAT DURCH MENSCHLICHES SERUM

Die einzelnen bei der Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat erhaltenen Werte sind aus der Tabelle 2 zu entnehmen.

Die bei pH 7,0 gemessenen Aktivitäten lagen zwischen 156 und 528 U/l. Das entsprechende Histogramm ist in der Abbildung 7 dargestellt. Wie aus dem Histogramm zu ersehen, ist die Verteilung der einzelnen Aktivitäten, die im Bereich 225-275 U/l am meisten vertreten sind, einer Normalverteilung ähnlich. Mit der Ermittlung des Mahalanobis'schen Abstandes wurde die Abgrenzbarkeit der verschiedenen Paraoxonasetyphen in dieser Verteilung geprüft. Dabei wird der Abstand der durch das Außenkriterium "Hydrolysetyp von Paraoxon bei pH 11,2" ermittelten Mittelwerte ($\bar{x}_j$ bzw. $\bar{x}_{j'}$) der p-Nitrophenylacetat spaltenden Aktivitäten gegen die nach Formel (1) (s.u.) aus einzelnen Typen gemittelte gemeinsame Standardabweichung S_{inn} gemessen.

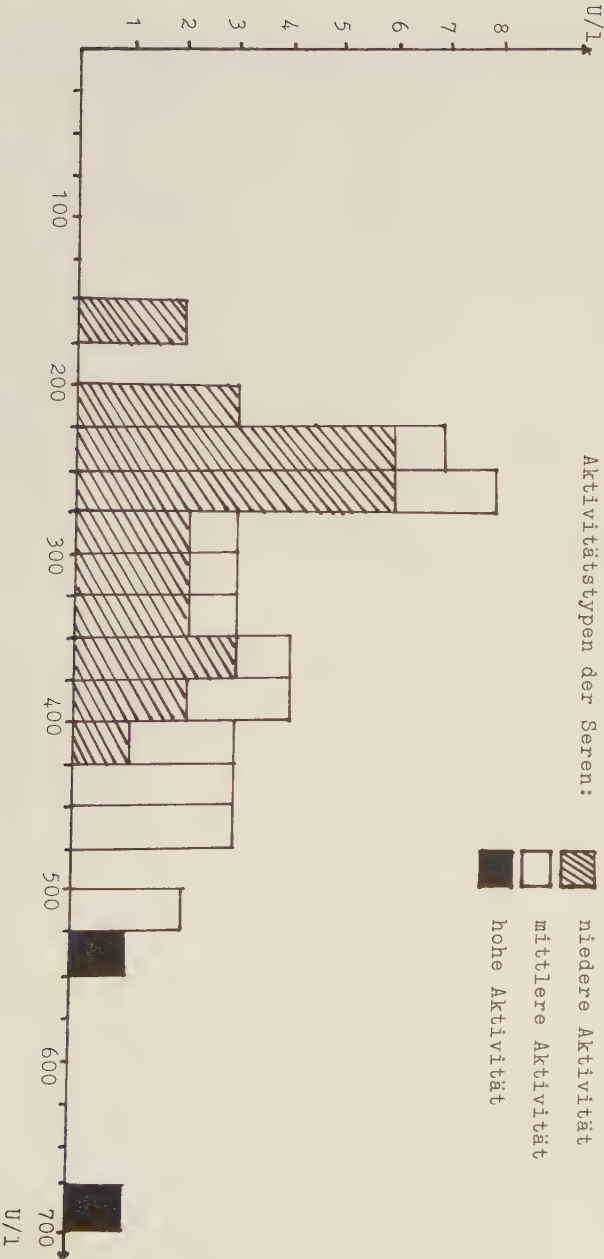
$$S_{inn}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_1} (x_{1i} - \bar{x}_1)^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (x_{2i} - \bar{x}_2)^2 + \sum_{i=1}^{n_3} (x_{3i} - \bar{x}_3)^2}{n_1 + n_2 + n_3 - 3} \quad (1)$$

Mahalanobis'scher Abstand M

$$\text{zwischen zwei Gruppen } j \text{ und } j' = \frac{(\bar{x}_j - \bar{x}_{j'})}{S_{inn}} \quad (2)$$

(für $j = 1, 2, 3$; und für $j' = 1, 2, 3$)

Anzahl der
Probanden



Die Aktivitätswerte der 50 Seren bezüglich ihrer Hydrolysefähigkeit in Bezug auf den Substrat p-Nitrophenylacetat werden den Aktivitätstypen, zu denen sie ihrem Verhalten nach bei der Spaltung von Paraoxon bei pH 11,2 (Standard-Test nach Krisch) gehören, zugeordnet. Es stellte sich dabei heraus, daß sich die Aktivitätswerte der Seren bezüglich der Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat im niedrigen und mittleren Aktivitätsbereich überschneiden, wie es auch bezüglich der Hydrolyse von Paraoxon bei pH 7,0 der Fall ist, so daß ein Korrelogramm zwischen der Hydrolyse von Paraoxon und von p-Nitrophenylacetat bei pH 7,0 mit strenger Abgrenzung des Aktivitätsbereiches nicht ohne weiteres möglich ist (Siehe Abb. 9). Dagegen ist ein Korrelogramm zwischen der Hydrolyse von Paraoxon bei pH 11,2 und der Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat bei pH 7,0 mit einer Abgrenzung des Aktivitätsbereiches in Abb. 8 relativ gut zu sehen. Der Korrelationskoeffizient der gesamten Wertepaare beträgt 0,788, der der niedrigen Aktivität beträgt 0,58 und der der mittleren Aktivität beträgt 0,80.

Die Werte von dem niedriger Aktivitätsbereich waren zwischen 156 und 386 U/l, die Werte von dem mittleren Aktivitätsbereich waren zwischen 244 und 519 U/l und die Werte von dem hohen Aktivitätsbereich waren 528 und 698 U/l. Dabei war die Form der Verteilung aller diesen Aktivitäten, wie sie in dem Histogramm in der Abb. 7 zu sehen ist, einer Normalverteilung ähnlich.

Abb.8: Korrelogramm der Hydrolyse von Paraoxon bei pH 11,2 und der Hydrolyse von p-Nitropheylacetat bei pH 7,0 durch menschliche Seren. Der Korrelationskoeffizient der gesamten Variablenpaare beträgt 0,788. Die Punktwolke ist unterteilt, ausgehend von den Aktivitätstypen bei der Hydrolyse von Paraoxon bei pH 11,2. Mitangegeben sind die Korrelationskoeffizienten der Wertepaare von dem niedrigem und mittlerem Aktivität.

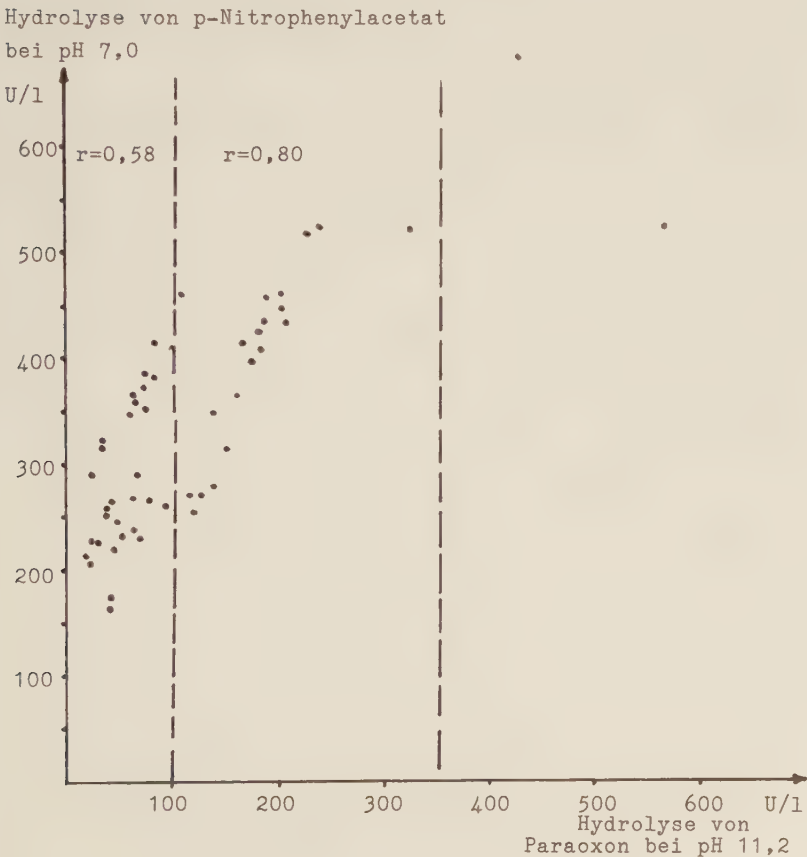
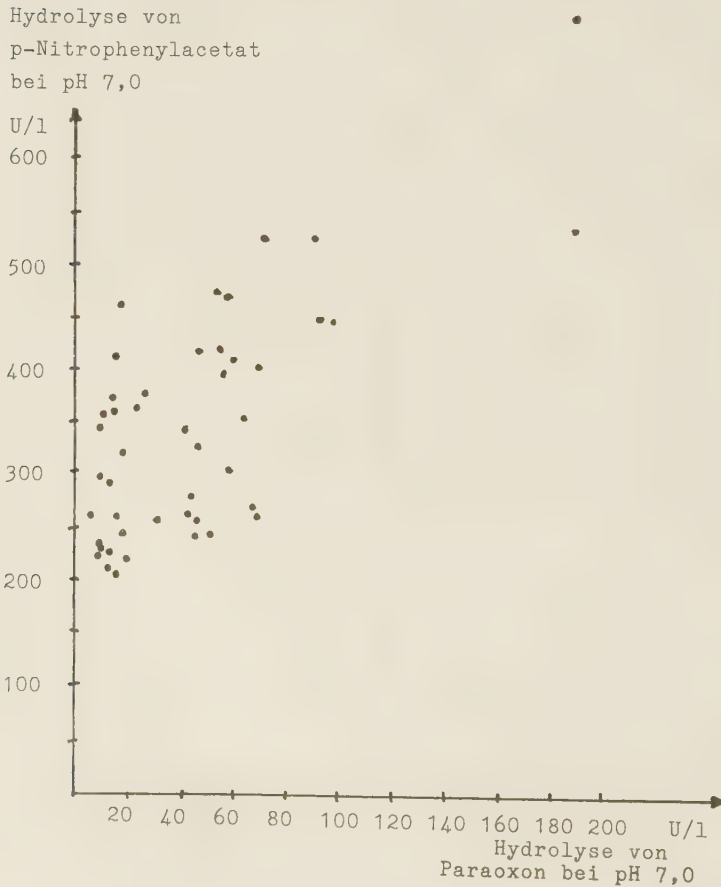


Abb.9: Korrelogramm der Hydrolyse von Paraoxon bei pH 7,0 und der Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat bei pH 7,0 durch menschliche Seren. Der Korrelationskoeffizient der gesamten Variablenpaare beträgt 0,702. Die Unterteilung der Punktwolke ist wegen der Überlappung der Typenzugehörigkeit der einzelnen Seren nicht möglich. Der statistisch ausgewertete Korrelationskoeffizient beträgt für die niedrige Aktivität $r = 0,053$ und für die mittlere Aktivität $r = 0,348$.



7. ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION

Der als statistisch gesichert geltende Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase diente als Grundlage beim Vergleich der enzymatischen Hydrolyse des Essigsäurederivates p-Nitrophenylacetat. Dazu wurden 50 Seren von aus der Erlanger Blutbank zufällig ausgewählten Probanden bezüglich ihres Hydrolysevermögens untersucht. Die Hydrolyse wurde in Anlehnung an den von Krisch (1968) entwickelten Standard-Test durch Messung der Absorption des abgespaltenen aciden Restes p-Nitrophenol spektrophotometrisch erfaßt. Aufgrund des günstigeren Verhältnisses zwischen dem Spontanzerfall und der serumbedingten Hydrolyse wurden die Messungen bei pH 7,0 durchgeführt.

Um eine größere Veränderung bzw. Einflüsse der Aktivitätsverteilung der Paraoxonase durch die pH-Änderung erfassen zu können, wurden die Messungen der Substrataktivität auch bei pH 11,2 (Standard-Test nach Krisch 1968) auch mit durchgeführt; man vergleicht dann die Hydrolyse von Paraoxon bei pH 7,0 mit der bei pH 11,2 und überprüft die Übereinstimmung der Variablenpaare im ganzen bzw. die Beständigkeit des Polymorphismus. Durch die Ermittlung eines Korrelationskoeffizienten von $r = 0,915$ konnte gesichert werden, daß der Polymorphismus der Paraoxonase auch bei pH 7,0 erhalten bleibt.

Beim statistischen Vergleich der enzymatischen Hydrolyse von Paraoxon bei pH 7,0 mit der enzymatischen Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat bei pH 7,0 wurde der Korrelationskoeffizient nach der Pearson-Formel bestimmt und mit dem Computer errechnet. Es ergab einen Korrelationskoeffizienten für das gesamte Kollektiv von $r = 0,702$, was bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 1\%$ signifikant von Null verschieden ist.

Kein Nachweis eines Zusammenhangs gelang nach Einteilung der Variablenpaare, ausgehend von den Aktivitätstypen bei der Hydrolyse von Paraoxon bei pH 11,2 (Standard-Test nach Krisch 1968), in die 3 Aktivitätstypen und deren isolierte statistische Überprüfung. So betrug der Korrelationskoeffizient der Variablenpaare des niedrigen Aktivitätstypes $r = 0,054$ und der Korrelationskoeffizient der Variablenpaare des mittleren Aktivitätstypes $r = 0,348$. Beide Korrelationskoeffizienten sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ nicht signifikant von Null verschieden. Der Korrelationskoeffizient der Variablenpaare des hohen Aktivitätstypes wurde mit Rücksicht auf die geringen Fallzahl ($n = 2$) nicht ausgewertet.

Der hier im Unterschied zu Korrelation des gesamten Kollektives nicht nachweisbare Zusammenhang könnte wahrscheinlich durch das relative Fehlen von Werten zwischen den einzelnen Aktivitätstypen erklärt werden. So dann ist nur bei Berücksichtigung des gesamten Kollektives, über das die Werte verteilt liegen, eine statistisch gesicherte Korrelation beider Versuchssysteme zu finden.

Aus den vorliegenden Ergebnissen dieses Versuches ist zu vermuten, daß die Aktivität der Paraoxonase nicht bei allen Substraten die typische dreigipflige Verteilung erkennen lässt, sondern auch in jener Form, einer Normalverteilung ähnlich, vorliegen können.

Einen Hinweis auf die unterschiedliche qualitative Struktur der Paraoxonase stellt die Beobachtung dar, daß sich die Aktivitäten von Enzymen angrenzender Typen überlappen.

8. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ALDRIDGE, W.N. :

Serumesterase: 1. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-Nitrophenyl-acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.

Biochem. j. 53. 110-113 (1953a)

ALDRIDGE, W.N. :

Serumesterase: 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl-phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.

Biochem. j. 53. 117-124 (1953b)

AUGUSTINSSON, K.B.:

Electrophoreses studies on blood plasma esterases

I. Mammalian plasmata

Acta chem. scand. 13. 571-592 (1959)

AUGUSTINSSON, K.B.; CASIDA, J.E.:

Enzymic hydrolysis of N:N-Dimethylcarbamoyl fluoride

Biochem. Pharmacol. 3. 60-67 (1959)

DUMBACH, J.:

Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2.)

Dissertation, Erlangen 1976

ERDÖS; E.C.; BOGGS, L.E.:

Hydrolysis of Paraoxon in mammalian blood

Nature 190, 716-717 (1961)

FITTKAU, S.:

Kompendium der organischen Chemie

3. neubearbeitete Auflage

Gustav-Fischer-Verlag (1976)

FLÜGEL, M.; GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M.:

Zur Kinetik der Paraoxon spaltenden Enzyme im menschlichen Serum (EC 3.1.1.2.)

Klin. Wochenschrift 56, 911-196 (1978)

BEILSTEIN:

II. Ergänzungswerk, Band IX Seite 312

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M.; RABAST, U.; LINDORF, H.H.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterase mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenyl-phosphat)

Arch. Toxikol. 25. 223.228 (1969)

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M.; BAUMGARTNER, W.; PETENYI, M.;

BURGIS, H.; LINDORF, H.H.; METZNER, H.:

Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergifbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-Systems in menschlichen Seren

Hoppe Seylers z. Physiol. Chem. 353. 217-220 (1972)

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M.; PETENYI, M.; FLÜGEL, M.;

BURGIS, H.; DIETZEL, B.; METZNER, H.; NIRSCHL, H.; RENNER, O.:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase

Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 354. 337-340 (1973)

GELDMACHER v. MALLINCKRODT, M.; LINDORF, H.H.; PETENYI, M.;
FLÜGEL, M.; FISCHER, T.; HILLER, T.:

Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen
Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2.)
Humangenetik 17. 331-335 (1973)

GELDMACHER v. MALLINCKRODT, M.; HOMMEL, G.; DUMBACH, J.:
On the genetics of human serum-paraoxonase (EC 3.1.1.2.)
Human Genetics 50. 313-326 (1979)

KRISCH, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-phosphat
durch menschliches Serum
Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 6. 41-47 (1968)

KUSCHINSKY, G.; LÜLLMANN, H.:

Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
8. überarbeitete und erweiterte Auflage
Stuttgart, Georg-Thieme-Verlag (1978)

MAIN, A.R.:

The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitro-
phenyl-phosphate (Paraoxon) in sheep serum
Canadian J. Biochem. 74. 10-20 (1960)

MENZEL, W.:

Die Serum-Arylesterasen (EC 3.1.1.2.) in der Literatur
von 1942 bis 1971
Dissertation, Erlangen (1978)

OWEN, D.B.:

Handbook of statistical Tables
Palo Alto, London, Addison-Wesley (1962)

PILZ, W.:

Beitrag zur Kenntnis der Uneinheitlichkeit der Arylesterase I
Z. Physiol. Chem. 328. 247-250 (1962b)

PILZ, W.; HÖRLEIN, H.:

Die mögliche Rolle der Arylesterase I im menschlichen
Fettstoffwechsel
Z. Physiol. Chem. 335. 221-228 (1964)

PILZ, W.; STELZL, E.; JOHANN, J.:

Die Arylesterasen des Kaninchenserums und ihre physiologische
Funktion
Enzym. Biol. Clin. 9. 97-123 (1968)

SCHRADER, G.:

Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester
3. Auflage
Weinheim/Bergstraße, Verlag Chemie (1963)

SIMPSON, N.E.:

Serum arylesterase levels of activity in twins and thier
parents
Amer. J. Hum. Genet. 23. 375-382 (1971)

ZECH, R.; ZÜRCHER, K.:

Organophosphate splitting serum enzymes in different mammals
Comp. Biochem. Phydol. (B) 48.427-433 (1974)

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M.; Th. L.DIEPGEN, DUHME. C.;
HOMMEL, G.:

A study of the polymorphismus and ethnic distribution differ-
ences of human serum paraoxonases
(in Vorbereitung)

Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut und die Überhanne des Korreferats.

Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, ihre stets freundliche Unterstützung und für die überaus große Hilfsbereitschaft.

Herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. G. Hommel und Herrn T. Diepgen für die Beratung bei der statistischen Auswertung meiner Versuchsergebnisse.

L E B E N S L A U F

Personalien: Yahya Kumala
geb. am 7. März 1957 in Jakarta, Indonesien.
Staatsangehörigkeit: indonesisch
Sohn von Andrew Kumala (verstorben, damals
evang. Pfarrer) und Jean Lydiana Kumala,
geb. Lay

Ausbildung: 1963-1969 Evang. Volksschule SKDN Jakarta
1969-1972 Kathol. Mittelschule Budi Mulia
 in Jakarta
1972-1975 Staat. Gymnasium XXV in Jakarta
1975 Abitur
1976-1977 Studienkolleg München
1977 WS Beginn des Studiums Human-Medizin
 an der Friedrich-Alexander Uni-
 versität Erlangen-Nürnberg
28.8.1979 Ärztliche Vorprüfung
26.3.1981 1. Abschnitt der Ärztlichen Prü-
 fung
20.8.1982 2. Abschnitt der Ärztlichen Prü-
 fung
7.11.1983 3. Abschnitt der Ärztlichen Prü-
 fung

